



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> :</b> <b>C12N 15/57, 9/52 // C12R 1/225</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 00/39309</b> <b>(43) Date de publication internationale: 6 juillet 2000 (06.07.00)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR99/03270 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 23 décembre 1999 (23.12.99) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 98/16462 24 décembre 1998 (24.12.98) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75338 Paris Cedex 07 (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> POQUET, Isabelle [FR/FR]; 56-62 rue de Vouillé, F-75015 Paris (FR). GRUSS, Alexandra [US/FR]; 25, rue Louis Scocard, F-91400 ORSAY (FR). BOLOTINE, Alexandre [RU/FR]; 5, rue Maréchal Gallieni, F-54000 Nancy (FR). SOROKINE, Alexei [RU/FR]; 8, res. les Quinconces, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR). <b>(74) Mandataires:</b> VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> GRAM-POSITIVE BACTERIA DEPRIVED OF HtrA PROTEASIC ACTIVITY AND THEIR USES <b>(54) Titre:</b> BACTERIES A GRAM POSITIF DEPOURVUES D'ACTIVITE PROTEASIQUE HtrA, ET LEURS UTILISATIONS <b>(57) Abstract</b> The invention concerns bacteria strains, obtained from gram-positive bacteria whereof the genome size is not more than 3.2 Mb, and wherein the HtrA surface protease is inactive. Said strains are useful for expressing exported proteins of interest. <b>(57) Abrégé</b> L'invention concerne des souches bactériennes, obtenues à partir de bactéries à gram-positif dont la taille du génome est au plus égale à 3,2 Mb, et dans lesquelles la protéase de surface HtrA est inactive. Ces souches sont utilisables pour l'expression de protéines d'intérêt exportées.		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

BACTERIES A GRAM POSITIF DEPOURVUES D'ACTIVITE  
PROTEASIQUE HtrA, ET LEURS UTILISATIONS.

L'invention concerne la production, chez des bactéries à Gram-positif, de protéines exportées.

5 On désigne sous le terme général de :  
« protéines exportées », des protéines qui sont transportées à travers la membrane cytoplasmique. Dans le cas des bactéries à Gram-positif, ce transport aboutit à la sécrétion de la protéine dans le milieu, ou à son  
10 association à la surface cellulaire.

L'un des principaux problèmes qui se pose lors de la production de protéines d'intérêt exportées par des bactéries-hôtes, réside dans la dégradation de ces protéines pendant et/ou après leur exportation, au niveau  
15 de l'enveloppe ou de la surface de la cellule. Cette dégradation entraîne souvent une baisse du rendement, et/ou une altération de la structure et de l'activité de la protéine.

Les enzymes responsables de cette dégradation  
20 des protéines exportées, sont des protéases bactériennes elles-mêmes exportées dans l'enveloppe ; il s'agit de protéases dites : « de ménage », qui ont normalement parmi leurs fonctions principales un rôle de dégradation de protéines exportées anormales ou mal repliées  
25 s'accumulant dans le milieu ou dans l'enveloppe, notamment en conditions de stress, ainsi qu'un rôle de recyclage des protéines exportées.

Les protéines hétérologues, qui sont souvent imparfaitement reconnues par les protéines chaperons  
30 intervenant dans le repliement des protéines chez la bactérie-hôte sont particulièrement sensibles à l'attaque de ces protéases.

La protéase de ménage exportée la plus anciennement caractérisée est la protéase à sérine  
35 HtrA/DegP d'*E. coli*. Il s'agit d'une protéase à localisation périplasmique, qui est exprimée sous

contrôle d'un promoteur inductible à haute température ;  
BECKWITH et STRAUCH (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:1576-  
1580, 1988) ont observé qu'elle intervenait dans la  
protéolyse de protéines de fusion entre des protéines  
5 exportées d'*E. coli* et le rapporteur de l'exportation  
PhoA. Ils ont proposé d'inactiver cette protéase chez *E.*  
*coli* afin de limiter la dégradation des protéines  
hétérologues exportées.

Des souches mutantes d'*E. coli*, dans  
10 lesquelles le gène codant pour la protéase HtrA/DegP a  
été inactivé ont ainsi été obtenues [BECKWITH et STRAUCH,  
publication précitée, et Demande PCT WO88/05821] ;  
cependant il a été constaté que cette inactivation se  
traduit par un ralentissement de la cinétique de  
15 dégradation, mais ne suffit pas pour l'abolir, du fait de  
l'existence dans l'enveloppe d'autres protéases dégradant  
les protéines exportées.

Chez *E. coli*, plusieurs protéases de ménage de  
l'enveloppe, assurant des fonctions similaires à celles  
20 de HtrA/DegP ont été caractérisées : il s'agit notamment  
des protéases HhoA/DegQ et HhoB/DegS, structurellement  
homologues à HtrA/DegP, et de protéases de structure  
différente mais fonctionnellement comparables  
(ApeA/protéaseI, OmpT, OmpP, Prc/Tsp, SppA/protéaseIV,  
25 PrtIII et SohB).

Des études concernant d'autres bactéries ont  
également permis de mettre en évidence l'existence dans  
chaque espèce étudiée, de plusieurs protéases de ménage  
exportées. Par exemple, de très nombreuses espèces  
30 bactériennes possèdent plusieurs protéases de la famille  
HtrA (PALLEN et WREN, Mol. Microbiol. 19:209-21, 1997) ;  
trois homologues de HtrA ont été identifiés chez *B.*  
*subtilis* (YyxA, YkdA et YvtB/Yirf), *Synechocystis* (HtrA,  
HhoA et HhoB), *Pseudomonas aeruginosa* et *Aquifex*  
35 *aeolicus*, deux chez *Haemophilus influenzae* (HtoA et  
HhoB), *Campylobacter jejuni*, *Brucella abortus* et *Yersinia*

enterolitica, et quatre chez *Mycobacterium tuberculosis*. Diverses bactéries à Gram-positif possèdent également des protéases à sérine considérées comme apparentées à la famille HtrA, sur la base d'une homologie au niveau du domaine catalytique : EtA, EtB, V8/StsP de *S. aureus*, GseP de *Bacillus licheniformis* et Spro de *Mycobacterium paratuberculosis* (KOONIN et al., Chap 117 in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, 2203-17, 1997). Enfin, des protéases exportées non-apparentées à HtrA, ont également été mises en évidence, par exemple chez *B. subtilis* (MARGOT et KARAMATA, Microbiology, 142:3437-44, 1996 ; STEPHENSON et HARWOOD Appl. Environn. Microbiol. 64:2875-2881, 1998 ; WU et al. J. Bacteriol. 173:4952-58, 1991).

Il a donc été proposé de combiner des mutations affectant plusieurs protéases exportées, pour parvenir à une réduction effective de la dégradation des protéines hétérologues exportées.

Par exemple, une souche d'*E. coli* mutée dans les gènes *degP/htrA*, *ompT*, *prt* et *prc* (MEERMAN et GEORGIOU, Bio/technology 12:1107-10, 1994), et une souche de *B. subtilis* déficiente dans les six protéases extracellulaires (WU et al., 1991, publication précitée), ont été construites dans ce but. Cependant, l'utilisation de ces souches ne permet pas d'éliminer totalement la protéolyse des protéines exportées. Par exemple, dans le cas de la souche de *B. subtilis* décrite par WU et al., bien que l'activité protéasique extracellulaire résiduelle soit négligeable (<1%), la dégradation des protéines hétérologues exportées reste importante. Pour pallier ce problème, cette même équipe a apporté des modifications supplémentaires à cette souche, afin de lui faire surproduire divers chaperons (WU et al., J. Bacteriol. 180:2830-35, 1998). En outre, bien que l'inactivation du gène d'une de ces protéases de ménage exportées n'ait pas de conséquences notables sur la

bactérie, le cumul des mutations peut affecter la viabilité des souches ; MEERMAN et GEORGIU, (1994, publication précitée) observent ainsi une diminution du taux de croissance pouvant aller jusqu'à 50%.

5                    Chez les bactéries lactiques, seules quelques protéases exportées ont fait l'objet d'études ; la mieux caractérisée à l'heure actuelle est la protéase dénommée PrtP (KOK, FEMS Microbiol. Reviews 87:15-42, 1990), qui est localisée à la surface cellulaire, où elle est ancrée  
10 au peptidoglycane. Cette protéase est présente chez de nombreuses bactéries lactiques, notamment *Lactococcus lactis*, où son gène est plasmidique. Elle participe à la nutrition azotée des bactéries en dégradant les caséines du lait. D'autres protéases de surface ont été purifiées  
15 à partir de deux espèces de bactéries lactiques, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Lactobacillus helveticus*, mais leur fonction n'a pas été déterminée. (STEFANITSI et al., FEMS Microbiol. Lett. 128:53-8, 1995 ; STEFANITSI et GAREL, Lett. Appl.  
20 Microbiol. 24:180-84, 1997 ; YAMAMOTO, et al., J. Biochem. 114:740-45, 1993). Récemment, un gène inductible par le stress codant pour une protéine fortement homologue aux protéases de la famille HtrA a été mis en évidence chez *Lactobacillus helveticus* (SMEDS et al., J.  
25 Bacteriol. 180:6148-53, 1998). Il a été observé que ce gène était nécessaire à la survie à température élevée ; une souche mutante de *Lactobacillus helveticus* dans laquelle le gène *htrA* a été inactivé par l'insertion d'un gène rapporteur (*gusA*, codant pour la  $\beta$ -glucuronidase)  
30 sous contrôle du promoteur *htrA*, a été construite. L'étude de l'expression du gène *gusA* dans ce mutant a permis de mettre en évidence une induction de la transcription de ce gène dans les mêmes conditions que celle du gène *htrA* dans les souches sauvages ; en  
35 revanche, aucune activité  $\beta$ -glucuronidase n'a été observée.

Lors de travaux précédents visant à caractériser des protéines exportées de *Lactococcus lactis* par l'étude de protéines de fusion avec le rapporteur d'exportation  $\Delta_{SpNuc}$  (POQUET et al., J. Bacteriol. 180:1904-12, 1998), l'équipe des Inventeurs a observé une importante protéolyse extra-cellulaire, bien que les expérimentations aient été effectuées dans une souche de *L. lactis* subsp. *cremoris* dépourvue de tout plasmide, et donc en particulier de celui qui porte *prtP*.

Les Inventeurs ont entrepris de rechercher des protéases extra-cellulaires responsables de cette protéolyse.

Ils ont ainsi découvert, chez *L. lactis*, l'existence d'un gène de la famille *htrA*.

Ce gène, mis en évidence dans le génome de la souche IL1403 de *L. lactis* subsp. *lactis*, code pour une protéine de 408 acides aminés, dénommée ci-après HtrA<sub>L1</sub> dont la séquence nucléotidique et la séquence en acides aminés sont représentées sur la Figure 1, et figurent dans la liste de séquences en annexe (SEQ ID NO: 1). Cette protéine est très homologue à HtrA d'*E. coli*, et à divers autres membres connus de la famille HtrA, comme le montre le Tableau I ci dessous, qui illustre les pourcentages d'identité et de similarité entre HtrA<sub>L1</sub> et différentes protéines de la famille HtrA :

TABLEAU I

Protéine	Organisme	% identité	% similarité
HtrA/DegP/ protéase Do	<i>E. coli</i>	31.5	38.2
HhoA/DegQ	<i>E. coli</i>	34.0	40.8
HhoB/DegS	<i>E. coli</i>	29.9	37.3
HtrA	<i>S. typhimurium</i>	32.4	39.1
HtoA	<i>H. influenzae</i>	31.9	39.2
HhoB/DegS	<i>H. influenzae</i>	31.2	40.0
spHtrA	<i>S. pneumoniae</i>	55.6	62.0
HtrA	<i>Lb. helveticus</i>	46.9	54.1
YyxA	<i>B. subtilis</i>	43.5	52.0
YkdA	<i>B. subtilis</i>	42.5	49.4

La protéine HtrA de la souche IL1403 de *L. lactis* subsp. *lactis* possède les trois acides aminés Ser,

His et Asp, qui définissent le site catalytique caractéristique des protéases à sérine apparentées à la trypsine, parmi lesquelles la famille HtrA ; en outre elle présente, autour de ces trois acides aminés, les  
5 trois motifs suivants : DAYVVTNYH<sub>127</sub>VI, D<sub>157</sub>LAVLKIS, et GNS<sub>239</sub>GGALINIEGQVIGIT, qui correspondent aux consensus définis par PALLÉN et WREN (Mol. Microbiol. 19:209-21, 1997) pour le domaine catalytique des protéases HtrA : -GY--TN-HV-, D-AV---- et GNSGG-L-N-G--IGIN.

10 Elle possède à son extrémité N-terminale une séquence d'acides aminés hydrophobes L<sub>10</sub>LTGVVGGAI<sub>26</sub> correspondant à un segment transmembranaire putatif. La protéine HtrA<sub>L1</sub> de *L. lactis* subsp. *lactis* serait donc une protéine intégrale de la membrane cytoplasmique. Selon la  
15 règle dite « du positif interne » concernant la topologie de ces protéines (VON HEIJNE, Nature, 341:456-8, 1989) sa topologie correspond au type « C-out », c'est-à-dire que sa partie C-terminale, qui comprend en particulier son site catalytique, serait exposée à l'extérieur de la  
20 membrane plasmique. Comme la protéase HtrA de *E. coli*, HtrA<sub>L1</sub> de *L. lactis* subsp. *lactis* apparaît donc comme une protéase de l'enveloppe, pouvant dégrader des protéines exportées. Les acides aminés du domaine catalytique et du domaine transmembranaire sont encadrés sur la figure 1.

25 Les Inventeurs ont procédé à l'inactivation de ce gène par mutation ; à température optimale (30°C), la souche mutante de *L. lactis* subsp. *lactis* ainsi obtenue est viable et croît normalement ; en revanche, sa croissance et sa viabilité sont affectées à plus hautes  
30 températures (à partir de 37°C), à la fois sur boîte et et en milieu liquide.

En outre, les Inventeurs ont étudié l'effet de cette mutation sur l'exportation de différentes protéines de fusion, et ont constaté que l'inactivation de la  
35 protéase HtrA<sub>L1</sub> chez *L. lactis* suffisait à abolir totalement la dégradation des protéines exportées ; cet



effet est surprenant, compte tenu de la protéolyse résiduelle observée antérieurement chez d'autres bactéries après inactivation de protéases de la famille HtrA.

5 La présente invention a pour objet un procédé pour la production d'une protéine d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'une souche bactérienne exprimant ladite protéine d'intérêt, et susceptible d'être obtenue à partir d'une bactérie à gram  
10 positif dont la taille du génome est au plus égale à 3,2 Mb, de préférence au plus égale à 3 Mb, et avantageusement au plus égale à 2,5 Mb, par mutation inactivant la protéase de surface HtrA de ladite bactérie ;

15 et l'obtention de ladite protéine d'intérêt exportée par ladite souche.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, la bactérie à gram-positif de départ est choisie parmi des bactéries du groupe constitué par  
20 les *Streptococcaceae*, et les *Lactobacillaceae*.  
Avantageusement, elle est choisie parmi les lactocoques.

Elle peut également être choisie parmi des bactéries appartenant au groupe constitué par les *Bacillaceae*, par exemple au genre *Listeria*, et les  
25 *Enterococcaceae*, notamment du genre *Enterococcus*.

Avantageusement, ladite souche bactérienne peut également comporter une ou plusieurs autres modifications de son génome, visant à améliorer la production et/ou la sécrétion de protéines exprimées dans  
30 ladite bactérie, et/ou à éviter leur dégradation. Selon le type de protéine que l'on souhaite obtenir, on peut par exemple utiliser une souche bactérienne dans laquelle l'activité protéasique PrtP a été inactivée, et/ou une souche bactérienne surproduisant une protéine permettant  
35 de stabiliser les protéines exportées, telle que la

protéine Nlp4 de *Lactococcus lactis*, ou un de ses homologues (POQUET et al. 1998, publication précitée).

La présente invention a également pour objet toute souche bactérienne, susceptible d'être obtenue à partir d'une bactérie à gram positif dont la taille du génome est au plus égale à 3,2 Mb, telle que définie ci-dessus, par mutation inactivant la protéase de surface HtrA de ladite bactérie, et comprenant en outre au moins une cassette d'expression d'un gène d'intérêt, à l'exception d'une souche de *Lactobacillus helveticus* comprenant une seule cassette d'expression, constituée par la séquence codant pour le gène rapporteur *gusA* insérée dans le gène *htrA* de ladite souche, sous contrôle transcriptionnel du promoteur dudit gène.

On entend par : « cassette d'expression » toute construction d'ADN recombinant comprenant un gène d'intérêt que l'on souhaite exprimer, ou un site permettant l'insertion dudit gène, placé sous contrôle de séquences de régulation de la transcription (promoteur, terminateur) fonctionnelles dans la bactérie-hôte concernée.

Au sens de la présente invention, on entend par : « protéase HtrA » toute protéase à sérine de type trypsine, présentant des similitudes fonctionnelles et structurelles suffisantes avec la protéase HtrA de *E. coli*, pour pouvoir être regroupée dans la même famille, à savoir :

- un site catalytique formé par les trois acides aminés Ser, His et Asp ;
- la présence, autour de ce site catalytique, des régions consensus : -GY--TN-HV-, D-AV---- et GNSGG-L-N-G-IGIN ;
- un signal d'exportation permettant à la protéase d'être transportée jusqu'à la surface cellulaire de la bactérie (il peut s'agir, par exemple, d'un peptide

signal, d'un domaine transmembranaire, d'un signal d'ancrage à la paroi, etc.).

Pour la mise en œuvre de la présente invention, on peut obtenir des bactéries mutantes 5 dépourvues d'activité HtrA en effectuant une ou plusieurs mutations, notamment au niveau de la séquence codant pour la protéase HtrA et/ou au niveau des séquences de régulation permettant l'expression du gène *htrA*, de manière à empêcher l'expression d'une protéase HtrA 10 fonctionnelle. Ces mutations peuvent être effectuées de manière classique, par délétion, insertion, ou remplacement d'au moins un nucléotide ou une séquence nucléotidique dans le gène HtrA ; elles peuvent résulter soit en l'absence de production de HtrA, soit en la 15 production d'une protéase HtrA dans laquelle au moins un acide aminé nécessaire à l'activité a été délété ou remplacé.

Les techniques de mutagenèse appropriées sont connues en elles-mêmes ; avantageusement, on utilisera 20 des techniques de mutagenèse dirigée, dans la mesure où les données disponibles sur les protéases de la famille HtrA permettent, même si l'on ne dispose pas d'informations plus précises sur la séquence spécifique du gène que l'on souhaite inactiver, de cibler la ou les 25 mutations sur des domaines conservés nécessaires à l'activité (par exemple le domaine catalytique).

La présente invention peut être mise en œuvre dans de nombreux domaines.

En premier lieu, elle peut être utilisée dans 30 le domaine de la production de protéines d'intérêt (par exemple enzymes, protéines humaines, etc.) par génie génétique à partir de cultures de bactéries transformées par un gène d'intérêt. Dans ce domaine, la présente invention permet d'améliorer le rendement en protéines 35 exportées (et en particulier sécrétées), et d'éviter leur

contamination par des produits de protéolyse, inactifs : ceci permet de les purifier facilement et à moindre coût.

Pour cette application on utilisera de préférence des souches mutantes obtenues à partir de bactéries non-pathogènes, telles que *Lactococcus* spp.,  
5 *Lactobacillus* spp., ainsi que des streptocoques alimentaires, *Streptococcus thermophilus*.

Les souches mutantes obtenues à partir de bactéries habituellement utilisées en industrie agro-  
10 alimentaire, telles que les bactéries lactiques (notamment, les lactocoques, les lactobacilles et les streptocoques thermophiles), peuvent avantageusement être utilisées dans ce même domaine. Par exemple, on peut les utiliser dans la composition de ferments, pour produire  
15 des protéines hétérologues permettant d'améliorer la qualité du produit fermenté fini ; ainsi, l'exportation d'enzymes étrangères produites par une souche mutante de *L. lactis* conforme à l'invention, au sein de fromages fermentés par *L. lactis* peut améliorer leur affinage et  
20 leurs qualités organoleptiques.

Ces souches mutantes peuvent également être utilisées pour l'obtention de produits diététiques ou de médicaments. Dans ce domaine on peut par exemple utiliser des souches mutantes conformes à l'invention afin  
25 d'exprimer, préalablement à l'ingestion du produit, et/ou après son ingestion, des protéines à effet prophylactique ou-thérapeutique, telles que des enzymes (permettant par exemple de faciliter la digestion), des protéines permettant de stimuler le système immunitaire, des  
30 antigènes vaccinaux, etc. Dans la plupart des cas, on préférera, pour les utilisations dans ce domaine, et afin de garantir une innocuité maximale, des souches mutantes obtenues à partir de bactéries non pathogènes, et avantageusement, de bactéries habituellement utilisées  
35 pour l'alimentation. Cependant, dans le cadre d'utilisations vaccinales, on peut utiliser des souches

mutantes obtenues à partir de bactéries (notamment streptocoques, staphylocoques, entérocoques ou listeria) pathogènes, et de préférence, de variants de ces bactéries portant déjà une ou plusieurs mutations atténuant leur pouvoir pathogène ; l'inactivation de la protéine HtrA, en limitant les capacités de survie de ces bactéries en conditions de stress, peut contribuer à atténuer leur virulence, comme observé précédemment dans le cas de certaines bactéries à gram-négatif.

Dans le cadre de certaines applications, dans lesquelles la bactérie hôte doit être viable et capable de produire des protéines à des températures de l'ordre de 35 à 40°C, par exemple la production en fermenteur de certaines protéines, ou la production après ingestion, dans le tractus digestif de l'homme ou d'un animal, de protéines à activité thérapeutique ou prophylactique, on utilisera avantageusement des souches mutantes obtenues à partir de bactéries thermophiles, telles que *Streptococcus thermophilus*.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs, illustrant l'obtention de mutants de *L. lactis* dans lesquels la protéase de surface HtrA est inactive, et les propriétés de ces mutants.

#### **EXEMPLE 1 : INACTIVATION DU GENE *htrA* DE *L. lactis***

Le gène *htrA*, porté par le chromosome de la souche IL1403 (CHOPIN et al. Plasmid, 11, 260-263, 1984) de *L. lactis* subsp. *lactis*, a été inactivé par intégration d'un plasmide suicide portant un fragment interne du gène (FA) de 665 pb.

A titre de témoin positif d'intégration, on a utilisé un plasmide suicide portant un fragment tronqué en 3' (GA) de 902pb, dont l'intégration sur le chromosome restitue une copie sauvage du gène.

Ces fragments ont été préalablement obtenus par amplification PCR, à partir de l'ADN génomique de la

souche IL1403 de *L. lactis* subsp. *lactis*, en utilisant les couples d'amorces F/A et G/A :

- F [5'-GGAGCCA(G/T)(A/C/T)GC(A/G/C/T)(C/T)T(A/G/T)GG-3']

localisée en aval du codon d'initiation ATG

5 - G [5'-GTTTCCACTTTTCTGTGG-3']

localisée en amont du promoteur de *htrA*

- A [5'-TT(A/T)CC(A/T)GG(A/G)TT(A/G/T)AT(A/G/C/T)GC-3'].

localisée en amont du codon de la sérine du site catalytique.

10 L'emplacement des amorces, F, G, et A, est indiqué sur la figure 1.

L'amplification a été effectuée dans les conditions suivantes :

- mélange réactionnel : 0,2mM de chaque dNTP,  
15 5µM de chaque oligonucléotide, environ 500ng d'ADN chromosomique, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 unité de Taq-DNA-pol (BOEHRINGER MANNHEIM) dans le tampon Taq fourni par le fabricant ;

- conditions de température : 5min 94°C, 30  
20 cycles (30sec à 94°C, 30sec à 46°C et 30sec à 72°C), et 4°C.

Les fragments amplifiés ont été ligaturés au plasmide linéaire pGEM<sup>T</sup> (PROMEGA). Après transformation de *E. coli* TG1 par les produits de ligation, les clones  
25 résistants à l'ampicilline, et dépourvus d'activité β-galactosidase sont sélectionnés. Les plasmides obtenus, portant respectivement les fragments FA et GA, sont dénommés pES1.1 et pES2.1.

Les inserts FA et GA ont été sous-clonés dans  
30 un vecteur suicide portant un gène de résistance au chloramphénicol. Ce vecteur étant incapable de se répliquer seul en l'absence de la protéine RepA qui est nécessaire à l'initiation de sa réplication, des co-intégrats ont été créés par ligation entre chacun des  
35 plasmides pES1.1 et pES2.1, et le vecteur suicide, préalablement linéarisés.

Après transformation de la souche TG1 d'*E. coli*, et sélection des clones résistant au chloramphénicol, la partie pGEM<sup>T</sup> des cointégrats a été déléetée, et les vecteurs re-circularisés. Les plasmides  
5 obtenus sont multipliés dans la souche d'*E. coli* TG1 repA<sup>+</sup>; après sélection des clones résistant au chloramphénicol, on obtient les plasmides suicide dénommés pVS6.1 et pVS7.4.

pVS6.1 contient le fragment FA, et pVS7.4  
10 contient le fragment GA du gène *htrA<sub>LI</sub>* de la souche IL1403 de *L. lactis* subsp. *lactis*.

Ces plasmides ont été utilisés pour transformer la souche IL1403 de *L. lactis* subsp. *lactis*; les clones ayant intégré ces plasmides au locus *htrA* sur  
15 le chromosome ont été sélectionnés en présence de chloramphénicol.

Dans les deux cas, plusieurs clones indépendants résistants au chloramphénicol ont été obtenus. Cinq clones de chaque classe, notés A à E dans  
20 le cas de l'intégration de pVS6.1, et 17 à 22 dans le cas de l'intégration de pVS7.4, ont été choisis pour analyse.

Pour chacun de ces clones, l'intégration au locus *htrA* a été confirmée par transfert de Southern.

Deux clones, A et 17, ont été choisis pour les  
25 analyses suivantes; ils constituent les deux prototypes des souches mutantes, qui seront dénommées ci-après:

- *htrA* (mutation nulle du gène *htrA<sub>LI</sub>*, Cm<sup>R</sup>); cette souche n'exprime pas de protéase HtrA active;
- *htrA<sup>+</sup>/htrA* (copie sauvage + copie tronquée  
30 du gène *htrA<sub>LI</sub>*, Cm<sup>R</sup>); cette souche exprime une protéase HtrA<sub>LI</sub> active.

#### **EXEMPLE 2 : ROLE DU GENE *htrA<sub>LI</sub>* DE *L. lactis* DANS LA SURVIE A HAUTE TEMPERATURE**

Les deux souches *htrA* et *htrA<sup>+</sup>/htrA* sont  
35 cultivées, en culture liquide, dans les conditions habituelles de croissance de *L. lactis*, c'est-à-dire à

30°C et en présence d'oxygène mais sans agitation, et en présence de chloramphénicol.

Le comportement de la souche *htrA* de *L. lactis* subsp. *lactis* à 30°C et à 37°C, a été étudié en utilisant comme  
5 témoins la souche *htrA<sup>+</sup>/htrA*, ainsi que la souche-mère IL403 (cultivée en l'absence de chloramphénicol).

Les bactéries ont été cultivées pendant 1 nuit à température ambiante, en milieu M17 contenant 1% de glucose (+2,5 µg/ml chloramphénicol pour les deux souches  
10 *htrA* et *htrA<sup>+</sup>/htrA*). Les cultures ont été diluées au 1/100<sup>ième</sup> le matin dans le même milieu, et divisées en deux lots placés en semi-anaérobiose à 30°C ou à 37°C. La croissance a été suivie par mesure de la DO<sub>600</sub>.

Les résultats sont illustrés par la Figure 2.

15 A 30°C (Fig. 2A), on constate que la souche *htrA<sup>+</sup>/htrA* (■), la souche *htrA* (◆), et la souche sauvage IL1403 (▲) présentent des temps de génération très proches : 65 min pour la souche sauvage, 70 min. pour *htrA<sup>+</sup>/htrA*, et 75 min pour *htrA* ; enfin, pour les 3  
20 cultures, les valeurs de DO<sub>600</sub> correspondant à la phase stationnaire sont très comparables (DO<sub>600</sub> = 2,1 à 2,2).

Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas de différence de croissance significative entre ces trois souches à 30°C.

25 A 37°C (Fig. 2B), la souche *htrA<sup>+</sup>/htrA* (■) a un temps de génération de 100 min, et la DO<sub>600</sub> de la phase stationnaire est moindre qu'à 30°C (DO<sub>600</sub> = 1,25). Une croissance plus faible à 37°C qu'à 30°C est également observée pour la souche sauvage IL1403 (▲) ; le temps de  
30 génération est de 65 min, mais la DO<sub>600</sub> de la phase stationnaire est plus faible qu'à 30°C (DO<sub>600</sub> = 1,9). Dans le cas de la souche *htrA* (◆) la croissance est très faible, voire nulle, et DO<sub>600</sub> ne dépasse pas 0,1 même après 7h de culture.



Il ressort de ces résultats que la souche *htrA* de *L. lactis* subsp. *lactis* est thermosensible, et que la mutation *htrA* est létale à 37°C.

EXEMPLE 3 : ROLE DU GENE *htrA<sub>L1</sub>* DE *L. LACTIS* DANS LA  
5 PROTEOLYSE DE SURFACE

L'effet de la mutation *htrA<sub>L1</sub>* sur la stabilité de cinq protéines exportées a été testé. Ces protéines sont :

i) une protéine hétérologue, la nucléase  
10 sécrétée de *S. aureus*, Nuc ; cette protéine est exprimée par le plasmide pNuc3 (LE LOIR et al., J. Bacteriol. 176:5135-5139, 1994 ; LE LOIR et al., J. Bacteriol. 180:1895-903 1998) ;

ii) trois protéines hybrides (*Usp-Δ<sub>SP</sub>Nuc*,  
15 *Nlp4-Δ<sub>SP</sub>Nuc*, et *Exp5-Δ<sub>SP</sub>Nuc*) résultant de la fusion entre le rapporteur *Δ<sub>SP</sub>Nuc* et des fragments de protéines exportées de *L. lactis* : la protéine sécrétée *Usp45* (VAN ASSELDONK et al., Gene 95:155-60, 1990), la lipoprotéine *Nlp4*, et la protéine *Exp5* (qui est elle-même une protéine  
20 de fusion entre une protéine exportée et une protéine cytoplasmique) ; ces protéines, ainsi que les plasmides pVE8009, pVE8024 et pVE8021 qui les expriment respectivement, sont décrits par POQUET et al. (1998, publication précitée) ;

25 iii) une protéine naturellement exportée de *L. lactis*, *AcmA*.

Chez la souche sauvage MG1363 de *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Usp-Δ<sub>SP</sub>Nuc* est sécrétée, *Nlp4-Δ<sub>SP</sub>Nuc* est associée aux cellules ; pour ces 2 protéines, on détecte  
30 dans le milieu, à côté de la forme mature, différents produits de dégradation, parmi lesquels le peptide *NuCA* provenant de la partie *Δ<sub>SP</sub>Nuc* de la fusion ; quant à la fusion tripartite *Exp5-Δ<sub>SP</sub>Nuc*, elle est très instable et on ne détecte pas la forme mature dans le milieu mais  
35 seulement les produits de dégradation, dont le peptide *NuCA*. La forme mature, ainsi que les produits de

dégradation de ces trois protéines hybrides peuvent être détectées à l'aide d'anticorps anti-NucA.

La protéine naturellement exportée de *L. lactis* choisie est la bactériolysine AcmA (BUIST et al., J. Bacteriol. 177:1554-1563, 1995). Cette protéine qui dégrade le peptidoglycane est à la fois sécrétée et associée à la surface, probablement par affinité avec son substrat. Elle présente, aussi bien chez la souche MG1363 de *L. lactis* subsp. *cremoris* que chez la souche IL1403 de *L. lactis* subsp. *lactis*, des produits de protéolyse actifs et donc détectables, comme la protéine intacte, par zymogramme.

Les souches transformées par les plasmides exprimant ces différentes protéines sont cultivées à 30°C pendant plusieurs heures, au moins jusqu'au milieu de la phase exponentielle ou jusqu'au début de la phase stationnaire.

Pour chaque plasmide, des cultures des trois souches IL1403, *htrA*, et *htrA*<sup>+</sup>/*htrA*, ayant atteint des DO<sub>600</sub> comparables ont été utilisées pour extraire des échantillons protéiques : a) de la culture totale, b) des cellules, c) du milieu, selon le protocole décrit par POQUET et al., (1998, publication précitée).

Ces échantillons sont soumis à une électrophorèse (SDS-PAGE) sur gel dénaturant.

Pour détecter les protéines Nuc, Usp- $\Delta_{Sp}$ Nuc, Nlp4- $\Delta_{Sp}$ Nuc, Exp5- $\Delta_{Sp}$ Nuc, et leurs produits de dégradation, on procède à un transfert des protéines sur membrane, puis à une révélation immunologique grâce à des anticorps anti-NucA, qui sont détectés à l'aide d'un conjugué protéine G/peroxydase (BIO-RAD), et d'un kit de chimioluminescence (DUPONT-NEN).

AcmA est détecté par zymogramme (BUIST et al., 1995, publication précitée) : des microcoques dont la paroi est sensible à AcmA sont inclus dans le gel d'électrophorèse à la concentration de 0,2%, ce qui le

rend opaque ; après électrophorèse, le gel est traité à 37°C pendant une nuit dans un tampon contenant 50mM de Tris/HCl à pH7 et 0,1% de Triton X100, ce qui permet la lyse des microcoques par AcmA ou ses produits de protéolyse actifs. Le gel est ensuite coloré par du bleu de méthylène à 0,1% dans du KOH à 0,01% : les bandes correspondant à l'activité AcmA apparaissent comme des halos d'hydrolyse transparents sur fond bleu.

Pour chaque protéine, les profils de dégradation dans les souches IL1403, *htrA*, et *htrA<sup>+</sup>/htrA*, ont été comparés en observant le contenu protéique accumulé pendant plusieurs heures de culture.

Les Figures 3 à 6 présentent respectivement les résultats de détection immunologique, pour les protéines Nuc, Usp- $\Delta_{Sp}$ Nuc, Nlp4- $\Delta_{Sp}$ Nuc et Exp5- $\Delta_{Sp}$ Nuc. Pour les protéines Nuc, (Fig.3) et Usp- $\Delta_{Sp}$ Nuc, (Fig.4),

La Fig. 7 représente un zymogramme de l'activité bactériolysine d'AcMA ; la détection a été effectuée sur l'ensemble de la culture (T), les cellules seules (C) ou le milieu (M).

#### Chez la souche IL1403 :

Pour les protéines sécrétées Nuc et Usp- $\Delta_{Sp}$ Nuc (Fig. 3 et 4 : trois premiers puits), et pour la lipoprotéine Nlp4- $\Delta_{Sp}$ Nuc (Fig.5 : premier puits), on détecte un profil de trois bandes, comme précédemment observé chez la souche MG1363 (LE LOIR et al., 1994 ; POQUET et al., 1998, publications précitées) :

a) celle de plus haut poids moléculaire est le précurseur dont le peptide-signal n'a pas été clivé, ce qui est confirmé par sa présence exclusive dans les cellules (Fig. 3 et 4) ;

b) la bande intermédiaire est la forme mature après clivage du peptide-signal, et elle est présente exclusivement dans le milieu dans le cas des protéines sécrétées Nuc et Usp- $\Delta_{Sp}$ Nuc (Fig. 3 et 4) ;

c) la bande de plus faible poids moléculaire est le peptide NucA qui comigre pratiquement avec la forme commerciale NucA purifiée à partir de *S. aureus* (la légère différence de migration étant due aux spécificités de clivage distinctes chez *S. aureus* et *L. lactis*), et qui se trouve à la fois libéré dans le milieu et associé aux cellules.

Pour la protéine Exp5- $\Delta_{SP}$ Nuc (Fig. 6 : premier puits) on ne détecte que très difficilement deux formes, une de haut poids moléculaire, et une de faible poids moléculaire, NucA, qui comigre pratiquement avec la forme purifiée commerciale ; la protéolyse chez IL1403 est donc pratiquement totale.

Pour la protéine AcmA (Fig. 7 : les trois premiers puits), on détecte comme précédemment observé chez la souche MG1363 (BUIST et al., 1995, publication précitée), un profil de quatre bandes :

a) celle de plus haut poids moléculaire est le précurseur dont le peptide-signal n'a pas été clivé, qui est présent exclusivement dans les cellules;

b) la bande de poids moléculaire légèrement inférieur est la forme mature après clivage du peptide-signal, qui est à la fois sécrétée dans le milieu et associée à la surface des cellules par affinité pour son substrat;

c et d) les deux bandes de plus faible poids moléculaire sont des produits de protéolyse actifs, à la fois sécrétés dans le milieu et associés à la surface des cellules par affinité pour leur substrat.

Chez la souche *htrA<sup>+</sup>/htrA* :

(Fig. 3 et 4 : trois derniers puits, Fig. 5 et 6 : dernier puits, et Fig. 7 : trois derniers puits). Les profils observés sont absolument identiques à ceux observés dans la souche sauvage. La souche *htrA<sup>+</sup>/htrA* présente donc un phénotype de protéolyse sauvage,

s'expliquant par la copie sauvage du gène *htrA<sub>LI</sub>* qu'elle possède.

Chez la souche *htrA* :

(Fig. 3 et 4 : trois puits centraux, Fig.5 et  
5 6 : puits central, et Fig. 7 : trois puits centraux).

Dans tous les cas, on ne détecte aucun des produits de protéolyse ; simultanément, la quantité de protéine mature (ou de haut poids moléculaire dans le cas de Exp5- $\Delta_{SpNuc}$ ) augmente.

10 Ces résultats montrent que le produit du gène *htrA<sub>LI</sub>* est bien responsable de la dégradation des protéines sécrétées, et que son inactivation entraîne l'abolition totale de cette dégradation.

## REVENDEICATIONS

1) Procédé pour la production d'une protéine d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en culture d'une souche bactérienne exprimant ladite protéine d'intérêt, et susceptible d'être obtenue à partir d'une bactérie à gram positif dont la taille du génome est au plus égale à 3,2 Mb, par mutation inactivant la protéase de surface HtrA de ladite bactérie ;
- l'obtention de ladite protéine d'intérêt exportée par ladite souche.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisée en ce que la bactérie à gram positif de départ est choisie parmi les *Streptococcaceae*, les *Lactobacillaceae*, les *Bacillaceae* des genres *Staphylococcus* et *Listeria*, et les *Enterococcaceae* du genre *Enterococcus*.

3) Procédé selon la revendication 2, caractérisée en ce que la bactérie à gram positif de départ est choisie dans le groupe constitué par *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., et *Streptococcus thermophilus*.

4) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la souche bactérienne utilisée est également dépourvue de l'activité protéasique PrtP.

5) Souche bactérienne, susceptible d'être obtenue à partir d'une bactérie à gram positif dont la taille du génome est au plus égale à 3,2 Mb, telle que définie dans une quelconque des revendications 1 à 3, par mutation inactivant la protéase de surface HtrA de ladite bactérie, et comprenant en outre au moins une cassette d'expression d'un gène d'intérêt, à l'exception d'une souche de *Lactobacillus helveticus* comprenant une seule cassette d'expression, constituée par la séquence codant pour le gène rapporteur *gusA* insérée dans le gène *htrA* de

ladite souche, sous contrôle transcriptionnel du promoteur dudit gène.

6) Souche bactérienne selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle est également dépourvue de l'activité protéasique PrtP.

7) Utilisation d'une souche bactérienne telle que définie dans une quelconque des revendications 1 à 4, pour la préparation d'un produit fermenté.

8) Utilisation d'une souche bactérienne telle que définie dans une quelconque des revendications 1 à 4, pour la préparation d'un aliment diététique.

9) Utilisation d'une souche bactérienne telle que définie dans une quelconque des revendications 1 à 4, pour la préparation d'un médicament.

10) Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit médicament est un vaccin.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



1 / 9

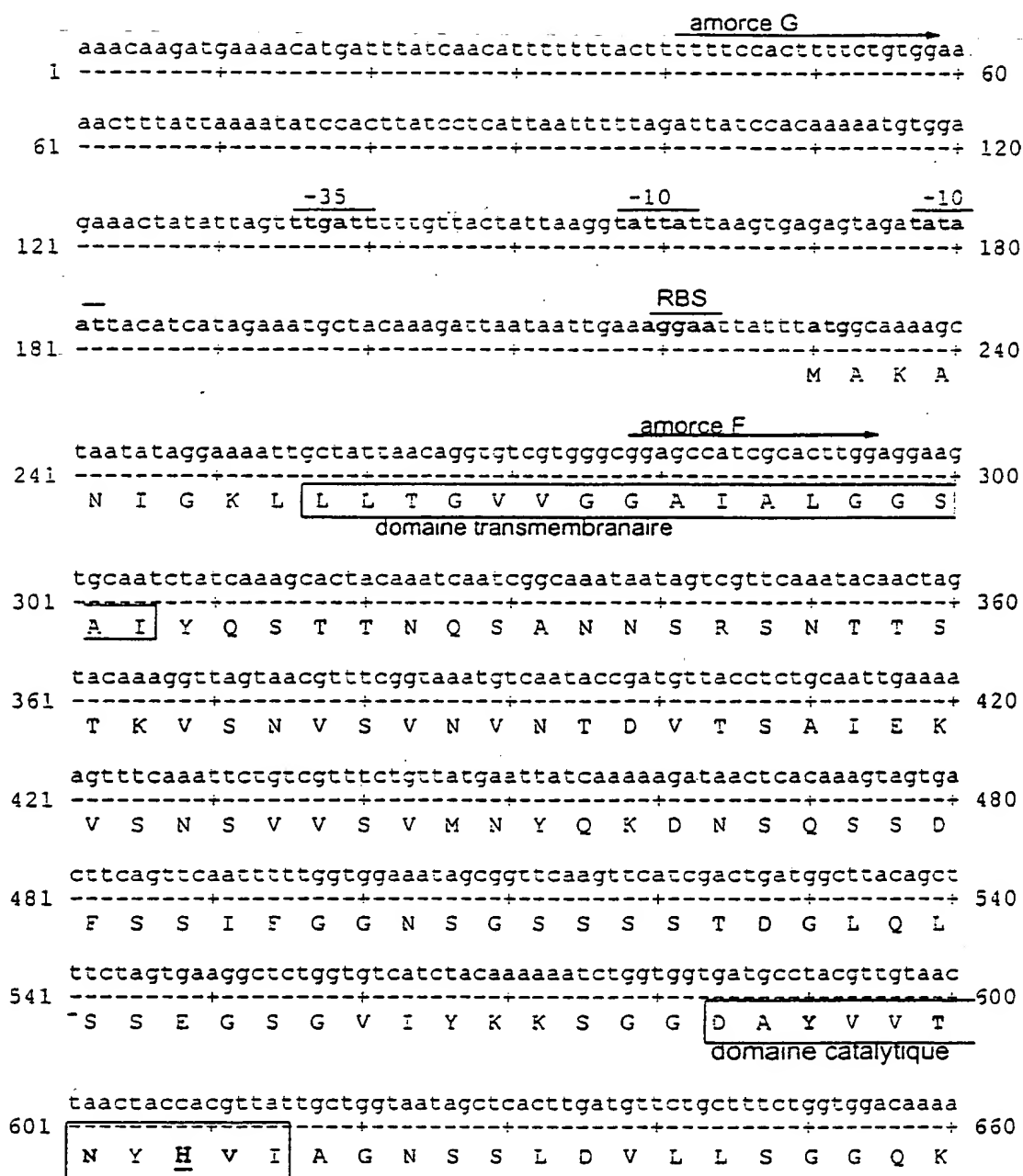


FIG. 1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2 / 9

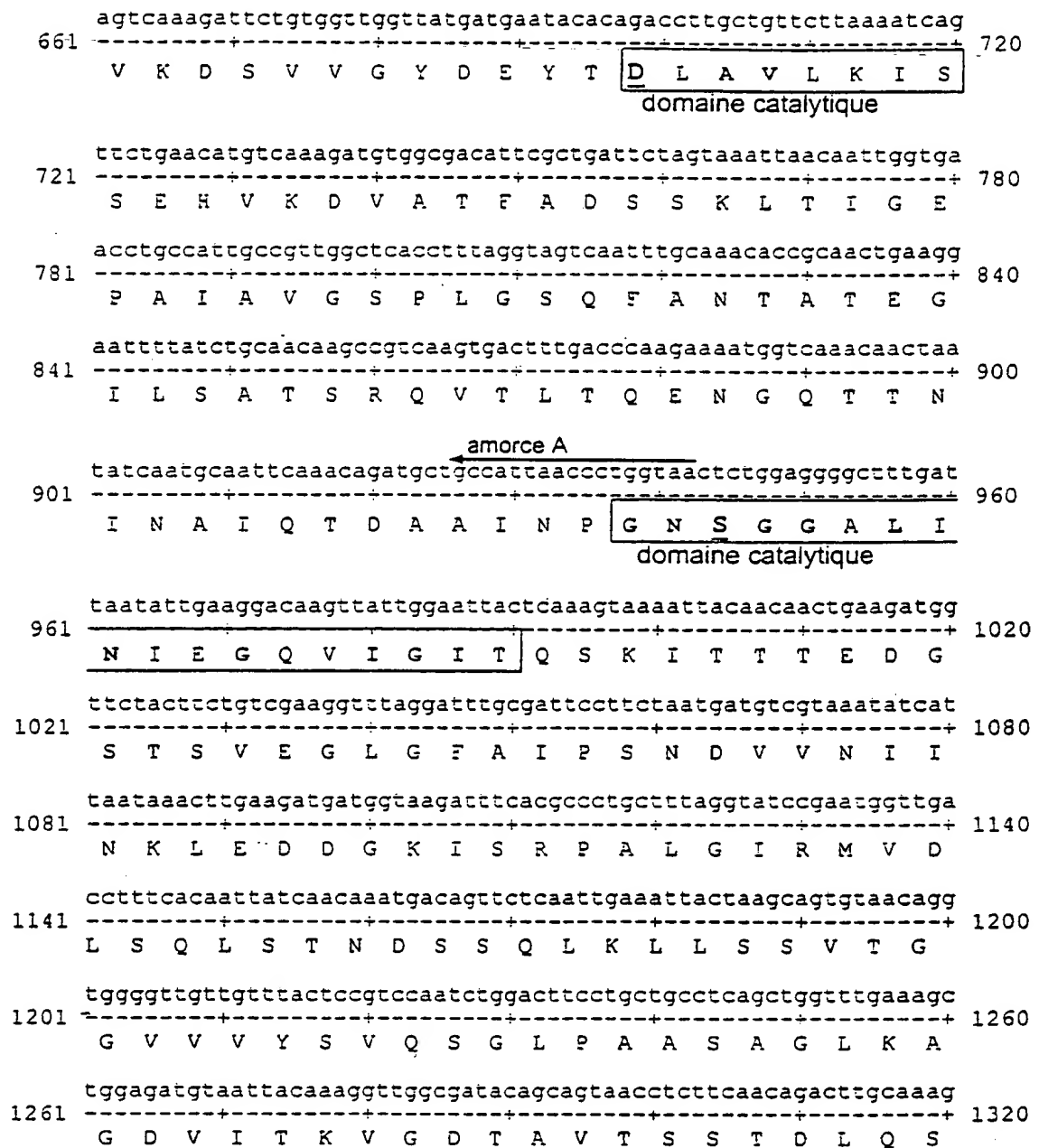


FIG. 1 (suite)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3 / 9

```

      tgctcttttactcacacaatatcaatgatacagtaaaaagttacttattatcgtgatggtaa
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
      A L Y S H N I N D T V K V T Y Y R D G K
      atcaaatacagcagatgttaaactttctaaatcaaccagtgacttagaaacaagcagtc
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
      S N T A D V K L S K S T S D L E T S S P
      atcttcttctaattaataacttaataatttaataaaaagtctctgtaaaatagaaggctt
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
      S S S N
      ttccataactaaagtctgaaatttttaaaaataataaatttccatttttcttttattgatt
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
      tatggtaaaaataaagttaagcatgaaaattttactttacttagaagccgaacaatttttg
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
      agtcattcaggaattggtcgtgcaatgaaacatcaacaacgcgccttgatttaatgggc
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
      attgactggacaaaaaatcctgaggatgattacgatatcctccatttaataacttatggc
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740

```

FIG. 1 (suite)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4 / 9

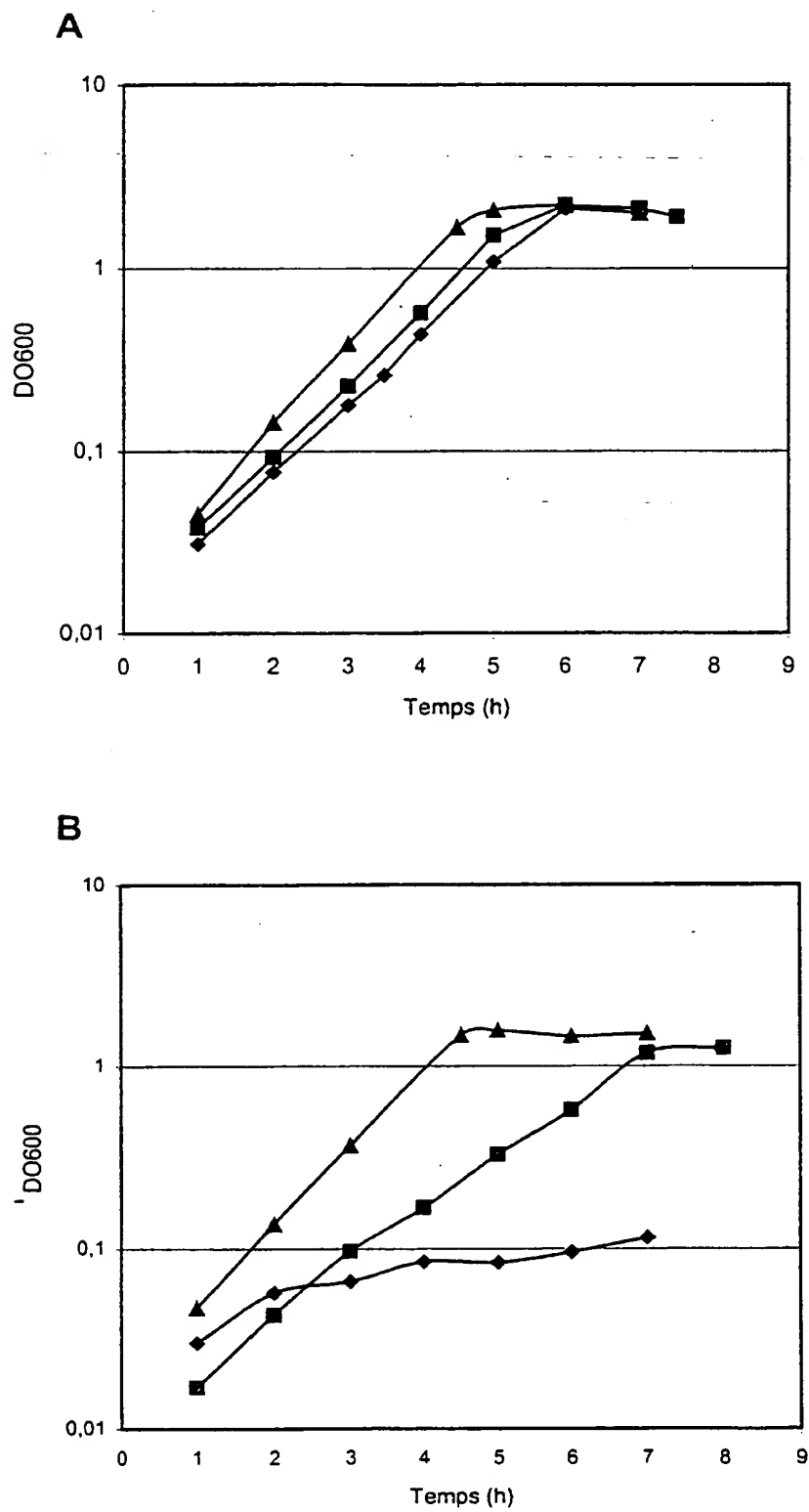


FIG. 2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



5 / 9

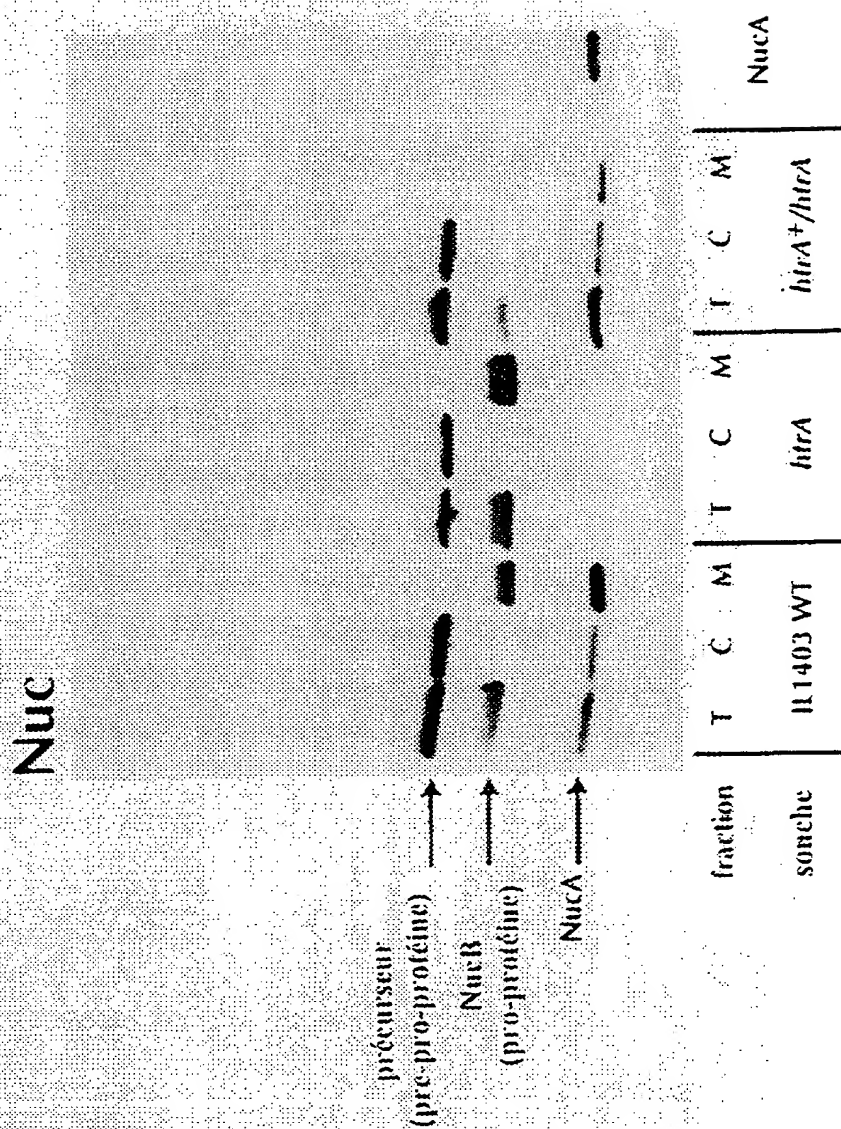


FIG. 3

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

6 / 9

Usp- $\Delta_{SP}$ Nuc

précurseur

forme mature

NucA

fraction	4U1403 WT			<i>htrA</i>			<i>htrA</i> <sup>+</sup> / <i>htrA</i>			NucA
	T	C	M	T	C	M	T	C	M	
souche										

FIG. 4

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

7/9

Nlp4- $\Delta_{Sp}$ Nuc

précurseur  
forme mature

NucA

IL1403 WT  
hcrA  
hcrA+hcrA  
NucA

FIG. 5

**THIS PAGE BLANK (USPTO,**

8 / 9

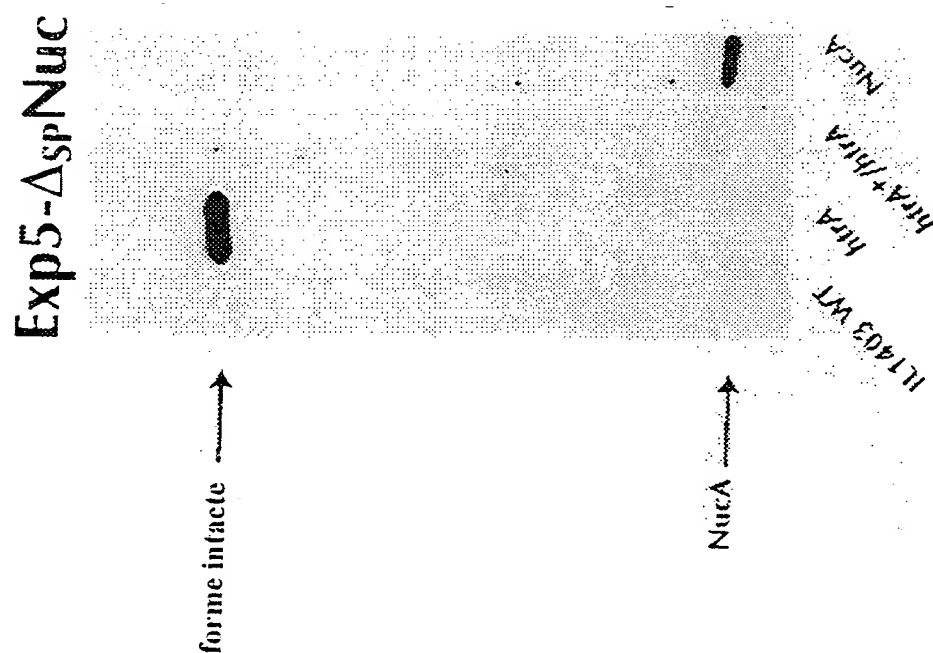


FIG. 6

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



9 / 9

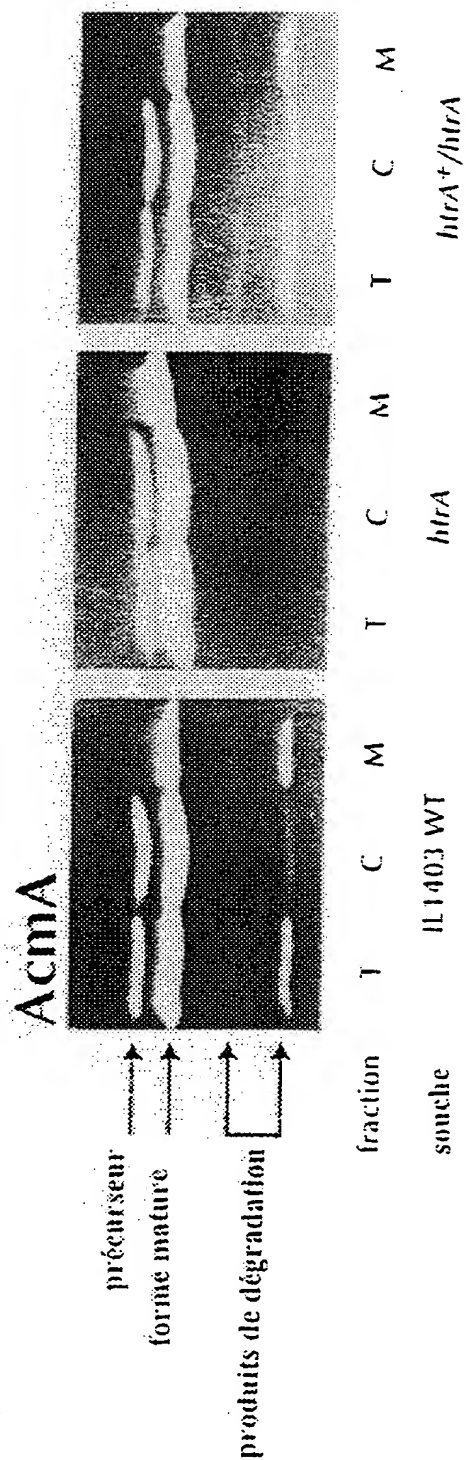


FIG. 7

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)  
 POQUET, Isabelle  
 GRUSS, Alexandra  
 BOLOTINE, Alexandre  
 SOROKINE, Alexei

<120> BACTERIES A GRAM POSITIF DEPOURVUES D'ACTIVITE  
 PROTEASIQUE HtrA, ET LEURS UTILISATIONS.

<130> MJPCb539/89

<140>

<141>

<150> FR9816462

<151> 1998-12-24

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1740

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> CDS

<222> (230)..(1453)

<400> 1

```

aaacaagatg aaaacatgat ttatcaacat ttttttactt ttttccactt ttctgtggaa 60
aactttatta aaatatccac ttatcctcat taatttttag attatccaca aaaatgtgga 120
gaaactatat tagtttgatt tttgttacta ttaaggtatt attaagtgag agtagatata 180
attacatcat agaaatgcta caaagattaa taattgaaag gaattatgtt atg gca aaa 238
                                     Met Ala Lys
                                     1

gct aat ata gga aaa ttg cta tta aca ggt gtc gtg ggc gga gcc atc 286
Ala Asn Ile Gly Lys Leu Leu Leu Thr Gly Val Val Gly Gly Ala Ile
      5              10              15

gca ctt gga gga agt gca atc tat caa agc act aca aat caa tcg gca 334
Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ile Tyr Gln Ser Thr Thr Asn Gln Ser Ala
      20              25              30              35

aat aat agt cgt tca aat aca act agt aca aag gtt agt aac gtt tcg 382
Asn Asn Ser Arg Ser Asn Thr Thr Ser Thr Lys Val Ser Asn Val Ser
              40              45              50

gta aat gtc aat acc gat gtt acc tct gca att gaa aaa gtt tca aat 430
Val Asn Val Asn Thr Asp Val Thr Ser Ala Ile Glu Lys Val Ser Asn
              55              60              65

tct gtc gtt tct gtt atg aat tat caa aaa gat aac tca caa agt agt 478
Ser Val Val Ser Val Met Asn Tyr Gln Lys Asp Asn Ser Gln Ser Ser
              70              75              80

```

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

gac ttc agt tca att ttt ggt gga aat agc ggt tca agt tca tcg act	526
Asp Phe Ser Ser Ile Phe Gly Gly Asn Ser Gly Ser Ser Ser Ser Thr	
85 90 95	
gat ggc tta cag ctt tct agt gaa ggc tct ggt gtc atc tac aaa aaa	574
Asp Gly Leu Gln Leu Ser Ser Glu Gly Ser Gly Val Ile Tyr Lys Lys	
100 105 110 115	
tct ggt ggt gat gcc tac gtt gta act aac tac cac gtt att gct ggt	622
Ser Gly Gly Asp Ala Tyr Val Val Thr Asn Tyr His Val Ile Ala Gly	
120 125 130	
aat agc tca ctt gat gtt ctg ctt tct ggt gga caa aaa gtc aaa gat	670
Asn Ser Ser Leu Asp Val Leu Leu Ser Gly Gly Gln Lys Val Lys Asp	
135 140 145	
tct gtg gtt ggt tat gat gaa tac aca gac ctt gct gtt ctt aaa atc	718
Ser Val Val Gly Tyr Asp Glu Tyr Thr Asp Leu Ala Val Leu Lys Ile	
150 155 160	
agt tct gaa cat gtc aaa gat gtg gcg aca ttc gct gat tct agt aaa	766
Ser Ser Glu His Val Lys Asp Val Ala Thr Phe Ala Asp Ser Ser Lys	
165 170 175	
tta aca att ggt gaa cct gcc att gcc gtt ggc tca cct tta ggt agt	814
Leu Thr Ile Gly Glu Pro Ala Ile Ala Val Gly Ser Pro Leu Gly Ser	
180 185 190 195	
caa ttt gca aac acc gca act gaa gga att tta tct gca aca agc cgt	862
Gln Phe Ala Asn Thr Ala Thr Glu Gly Ile Leu Ser Ala Thr Ser Arg	
200 205 210	
caa gtg act ttg acc caa gaa aat ggt caa aca act aat atc aat gca	910
Gln Val Thr Leu Thr Gln Glu Asn Gly Gln Thr Thr Asn Ile Asn Ala	
215 220 225	
att caa aca gat gct gcc att aac cct ggt aac tct gga ggg gct ttg	958
Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asn Pro Gly Asn Ser Gly Gly Ala Leu	
230 235 240	
att aat att gaa gga caa gtt att gga att act caa agt aaa att aca	1006
Ile Asn Ile Glu Gly Gln Val Ile Gly Ile Thr Gln Ser Lys Ile Thr	
245 250 255	
aca act gaa gat ggt tct act tct gtc gaa ggt tta gga ttt gcg att	1054
Thr Thr Glu Asp Gly Ser Thr Ser Val Glu Gly Leu Gly Phe Ala Ile	
260 265 270 275	
cct tct aat gat gtc gta aat atc att aat aaa ctt gaa gat gat ggt	1102
Pro Ser Asn Asp Val Val Asn Ile Ile Asn Lys Leu Glu Asp Asp Gly	
280 285 290	
aag att tca cgc cct gct tta ggt atc cga atg gtt gac ctt tca caa	1150
Lys Ile Ser Arg Pro Ala Leu Gly Ile Arg Met Val Asp Leu Ser Gln	
295 300 305	
tta tca aca aat gac agt tct caa ttg aaa tta cta agc agt gta aca	1198
Leu Ser Thr Asn Asp Ser Ser Gln Leu Lys Leu Leu Ser Ser Val Thr	
310 315 320	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

ggt ggg gtt gtt gtt tac tcc gtc caa tct gga ctt cct gct gcc tca 1246  
 Gly Gly Val Val Val Tyr Ser Val Gln Ser Gly Leu Pro Ala Ala Ser  
 325 330 335

gct ggt ttg aaa gct gga gat gta att aca aag gtt ggc gat aca gca 1294  
 Ala Gly Leu Lys Ala Gly Asp Val Ile Thr Lys Val Gly Asp Thr Ala  
 340 345 350 355

gta acc tct tca aca gac ttg caa agt gct ctt tac tca cac aat atc 1342  
 Val Thr Ser Ser Thr Asp Leu Gln Ser Ala Leu Tyr Ser His Asn Ile  
 360 365 370

aat gat aca gta aaa gtt act tat tat cgt gat ggt aaa tca aat aca 1390  
 Asn Asp Thr Val Lys Val Thr Tyr Tyr Arg Asp Gly Lys Ser Asn Thr  
 375 380 385

gca gat gtt aaa ctt tct aaa tca acc agt gac tta gaa aca agc agt 1438  
 Ala Asp Val Lys Leu Ser Lys Ser Thr Ser Asp Leu Glu Thr Ser Ser  
 390 395 400

cca tct tct tct aat taataactta ataatttaat aaaagtcttc tgtaaataga 1493  
 Pro Ser Ser Ser Asn  
 405

aggctttttt cataactaaag tctgaaattt ttaaaaataa taaattttcca tttttctttt 1553  
 attgatttat ggtaaaataa agttaagcat gaaaatttta ctttacttag aagccgaaca 1613  
 atttttgagt cattcaggaa ttggtcgtgc aatgaaacat caacaacgcg cccttgattt 1673  
 aatgggcatt gactggacaa aaaatcctga ggatgattac gatatcctcc atttaaatac 1733  
 ttatggc 1740

<210> 2  
 <211> 408  
 <212> PRT  
 <213> Lactococcus lactis

<400> 2  
 Met Ala Lys Ala Asn Ile Gly Lys Leu Leu Leu Thr Gly Val Val Gly  
 1 5 10 15

Gly Ala Ile Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ile Tyr Gln Ser Thr Thr Asn  
 20 25 30

Gln Ser Ala Asn Asn Ser Arg Ser Asn Thr Thr Ser Thr Lys Val Ser  
 35 40 45

Asn Val Ser Val Asn Val Asn Thr Asp Val Thr Ser Ala Ile Glu Lys  
 50 55 60

Val Ser Asn Ser Val Val Ser Val Met Asn Tyr Gln Lys Asp Asn Ser  
 65 70 75 80

Gln Ser Ser Asp Phe Ser Ser Ile Phe Gly Gly Asn Ser Gly Ser Ser  
 85 90 95

Ser Ser Thr Asp Gly Leu Gln Leu Ser Ser Glu Gly Ser Gly Val Ile  
 100 105 110

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Tyr Lys Lys Ser Gly Gly Asp Ala Tyr Val Val Thr Asn Tyr His Val  
 115 120 125  
 Ile Ala Gly Asn Ser Ser Leu Asp Val Leu Leu Ser Gly Gly Gln Lys  
 130 135 140  
 Val Lys Asp Ser Val Val Gly Tyr Asp Glu Tyr Thr Asp Leu Ala Val  
 145 150 155 160  
 Leu Lys Ile Ser Ser Glu His Val Lys Asp Val Ala Thr Phe Ala Asp  
 165 170 175  
 Ser Ser Lys Leu Thr Ile Gly Glu Pro Ala Ile Ala Val Gly Ser Pro  
 180 185 190  
 Leu Gly Ser Gln Phe Ala Asn Thr Ala Thr Glu Gly Ile Leu Ser Ala  
 195 200 205  
 Thr Ser Arg Gln Val Thr Leu Thr Gln Glu Asn Gly Gln Thr Thr Asn  
 210 215 220  
 Ile Asn Ala Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asn Pro Gly Asn Ser Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Ala Leu Ile Asn Ile Glu Gly Gln Val Ile Gly Ile Thr Gln Ser  
 245 250 255  
 Lys Ile Thr Thr Thr Glu Asp Gly Ser Thr Ser Val Glu Gly Leu Gly  
 260 265 270  
 Phe Ala Ile Pro Ser Asn Asp Val Val Asn Ile Ile Asn Lys Leu Glu  
 275 280 285  
 Asp Asp Gly Lys Ile Ser Arg Pro Ala Leu Gly Ile Arg Met Val Asp  
 290 295 300  
 Leu Ser Gln Leu Ser Thr Asn Asp Ser Ser Gln Leu Lys Leu Leu Ser  
 305 310 315 320  
 Ser Val Thr Gly Gly Val Val Val Tyr Ser Val Gln Ser Gly Leu Pro  
 325 330 335  
 Ala Ala Ser Ala Gly Leu Lys Ala Gly Asp Val Ile Thr Lys Val Gly  
 340 345 350  
 Asp Thr Ala Val Thr Ser Ser Thr Asp Leu Gln Ser Ala Leu Tyr Ser  
 355 360 365  
 His Asn Ile Asn Asp Thr Val Lys Val Thr Tyr Tyr Arg Asp Gly Lys  
 370 375 380  
 Ser Asn Thr Ala Asp Val Lys Leu Ser Lys Ser Thr Ser Asp Leu Glu  
 385 390 395 400  
 Thr Ser Ser Pro Ser Ser Ser Asn  
 405

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/03270

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12N15/57 C12N9/52 //C12R1/225

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANDRÉAS SMEDS ET AL.: "Molecular characterization of a stress-inducible gene from <i>Lactobacillus helveticus</i> " JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 180, no. 23, December 1998 (1998-12), pages 6148-6153, XP002113159 cited in the application	5
Y	abstract page 6149, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 3 page 6150, right-hand column, paragraph 2 - page 6152, left-hand column, paragraph 4 --- -/--	2,3

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 March 2000

Date of mailing of the international search report

29/03/2000

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/03270

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PALLEN M J ET AL: "The HtrA family of serine proteases." MOLECULAR MICROBIOLOGY, (1997 OCT) 26 (2) 209-21. REF: 72, XP002113160	1,5
Y	abstract page 209, right-hand column, paragraph 2 page 211, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, paragraph 2 page 215, left-hand column, last paragraph -page 216, right-hand column, paragraph 1 page 218, left-hand column, paragraph 4 ---	2,3
X	WO 88 05821 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF THE HARVARD COLLEGE) 11 August 1988 (1988-08-11) cited in the application page 2, line 17 - line 31 page 4, line 28 - line 34 page 5, line 25 -page 6, line 9; example 4 ---	1,5
X	WO 91 15572 A (THE WELCOME FOUNDATION LIMITED) 17 October 1991 (1991-10-17) page 2, last paragraph -page 3, paragraph 2 page 7, paragraph 2 -page 8, paragraph 1; examples 1,5 ---	5,9,10
X	US 5 264 365 A (GEORGE GEORGION ET AL.) 23 November 1993 (1993-11-23) column 2, line 58 -column 3, line 40 column 4, line 56 -column 5, line 13; examples 1-6 -----	1,4-6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/03270

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8805821 A	11-08-1988	AT 122391 T DE 3853745 D EP 0300035 A JP 1502320 T US 4946783 A	15-05-1995 14-06-1995 25-01-1989 17-08-1989 07-08-1990
WO 9115572 A	17-10-1991	AT 157397 T AU 659995 B AU 7541791 A CA 2079463 A DE 69127440 D DE 69127440 T DK 524205 T EP 0524205 A ES 2106776 T GR 3025258 T HU 65496 A IL 97720 A NZ 237616 A US 5804194 A US 5980907 A ZA 9102397 A	15-09-1997 08-06-1995 30-10-1991 01-10-1991 02-10-1997 02-01-1998 27-10-1997 27-01-1993 16-11-1997 27-02-1998 28-06-1994 20-06-1999 25-03-1994 08-09-1998 09-11-1999 25-11-1992
US 5264365 A	23-11-1993	US 5508192 A	16-04-1996

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. No Internationale No

PCT/FR 99/03270

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12N15/57 C12N9/52 //C12R1/225

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C12R

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ANDRÉAS SMEDS ET AL.: "Molecular characterization of a stress-inducible gene from <i>Lactobacillus helveticus</i> " JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 180, no. 23, décembre 1998 (1998-12), pages 6148-6153, XP002113159 cité dans la demande	5
Y	abrégé page 6149, colonne de gauche, alinéa 2 - alinéa 3 page 6150, colonne de droite, alinéa 2 -page 6152, colonne de gauche, alinéa 4 --- -/--	2,3

☒

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 mars 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/03/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Montero Lopez, B

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 99/03270

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PALLEN M J ET AL: "The HtrA family of serine proteases." MOLECULAR MICROBIOLOGY, (1997 OCT) 26 (2) 209-21. REF: 72, XP002113160	1,5
Y	abrégé page 209, colonne de droite, alinéa 2 page 211, colonne de gauche, alinéa 2 -colonne de droite, alinéa 2 page 215, colonne de gauche, dernier alinéa -page 216, colonne de droite, alinéa 1 page 218, colonne de gauche, alinéa 4 ---	2,3
X	WO 88 05821 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF THE HARVARD COLLEGE) 11 août 1988 (1988-08-11) cité dans la demande page 2, ligne 17 - ligne 31 page 4, ligne 28 - ligne 34 page 5, ligne 25 -page 6, ligne 9; exemple 4 ---	1,5
X	WO 91 15572 A (THE WELCOME FOUNDATION LIMITED) 17 octobre 1991 (1991-10-17) page 2, dernier alinéa -page 3, alinéa 2 page 7, alinéa 2 -page 8, alinéa 1; exemples 1,5 ---	5,9,10
X	US 5 264 365 A (GEORGE GEORGION ET AL.) 23 novembre 1993 (1993-11-23) colonne 2, ligne 58 -colonne 3, ligne 40 colonne 4, ligne 56 -colonne 5, ligne 13; exemples 1-6 ----- - -	1,4-6



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document International No

PCT/FR 99/03270

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 8805821 A	11-08-1988	AT 122391 T	15-05-1995
		DE 3853745 D	14-06-1995
		EP 0300035 A	25-01-1989
		JP 1502320 T	17-08-1989
		US 4946783 A	07-08-1990
WO 9115572 A	17-10-1991	AT 157397 T	15-09-1997
		AU 659995 B	08-06-1995
		AU 7541791 A	30-10-1991
		CA 2079463 A	01-10-1991
		DE 69127440 D	02-10-1997
		DE 69127440 T	02-01-1998
		DK 524205 T	27-10-1997
		EP 0524205 A	27-01-1993
		ES 2106776 T	16-11-1997
		GR 3025258 T	27-02-1998
		HU 65496 A	28-06-1994
		IL 97720 A	20-06-1999
		NZ 237616 A	25-03-1994
		US 5804194 A	08-09-1998
		US 5980907 A	09-11-1999
		ZA 9102397 A	25-11-1992
US 5264365 A	23-11-1993	US 5508192 A	16-04-1996

**THIS PAGE BLANK (U.S.)**